

# 超音波を用いた反応促進

( 酢酸菌のバクテリアセルロース生産 )

第2 技術室化学計測技術班 岡田文男

## 1. はじめに

微生物が生産するセルロースであるバクテリアセルロースは、網目構造を有しており、リグニンやヘミセルロースを全く含まない純粋なセルロースである。さらに、優れた高弾性、高結晶性等の物理的性質から、様々な工業、食品材料への応用が期待されている<sup>1) 2)</sup>。

本報告は、超音波を用いた反応促進の応用の一例として、バクテリアセルロースの生産性向上を目的としているが、今回はその第一段階とし、代表的なバクテリアセルロース生産菌である酢酸菌 ( *Acetobacter* sp. ) を用いて至適培養条件 ( 培地、pH、添加物等 ) を調べた。

## 2. バクテリアセルロースの特性

セルロースは、椅子型の D-グルコースが  $\beta$  1→4 グルコシド結合した直鎖状の高分子である。バクテリアセルロースの平均重合度は綿のセルロース繊維とほぼ同じ 2000~5700 程度である。マイクロフィブリルは幅 0.01~0.1  $\mu\text{m}$  のリボン状であり、植物セルロースの直径の約 100 分の 1 以下と極めて細い。

## 3. 実 験

### 3-1 菌 株

工学部池田研究室より供与された、乾燥酢酸菌 ( *Acetobacter* 属 ) を使用した。

### 3-2 培 地

本実験で使用した、前培養培地 ( 乾燥酢酸菌を増殖させるもの )、継体培地 ( 前培養培地で目覚めた菌を成長させ、定期的に植え替えることで保存するためのもの )、生産培地 ( セルロースを生産させるための培地 ) を Table 1 に示した。

Table 1 各種培地組成

培地成分 [w/v%]	前培養培地	継体培地	生産培地
Glucose	2	5	—
Sugar	—	—	5,10,20
Yeast extract	0.5	—	—
Bactopepton	0.5	—	—
Polypepton	—	1	1
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	—	0.3	0.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	0.05	0.05
$\text{CaCO}_3$	—	0.02	0.02
Beef extract	—	1	1
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.24	—	—
Citric acid	0.096	—	—

### 3-3 実験方法

生産培地 (142.5mL) に継体培地を 7.5mL (2%) 加え、総液量を 150mL として 500mL ビーカを用い、好気性条件下、所定 pH、30℃で所定時間静置培養した。24 時間毎にサンプリングし、

pH 値、糖量を測定した。生成したセルロース膜は、余分な培地成分や菌体を除くために、1% NaOH 水溶液で一昼夜除蛋白後、1% AcOH 水溶液で浸漬、水洗後蒸発皿で 100℃、24h 乾燥させ秤量した。バクテリアセルロースの培養の様子を Figs. 1, 2 に示した。Fig. 3 は秤量皿中の乾燥後の状態である。

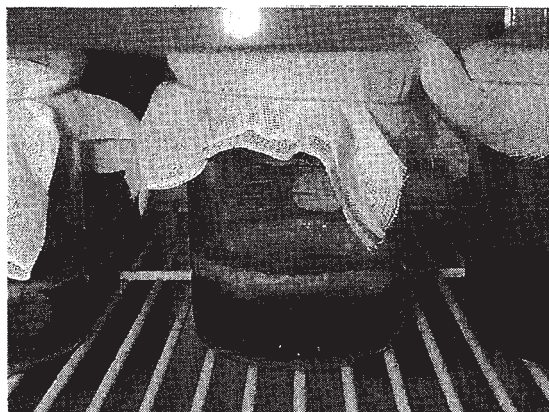


Fig. 1 静置培養の様子

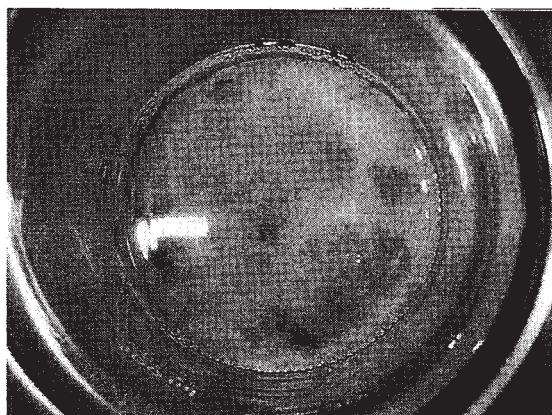


Fig. 2 1%NaOH による除タンパク

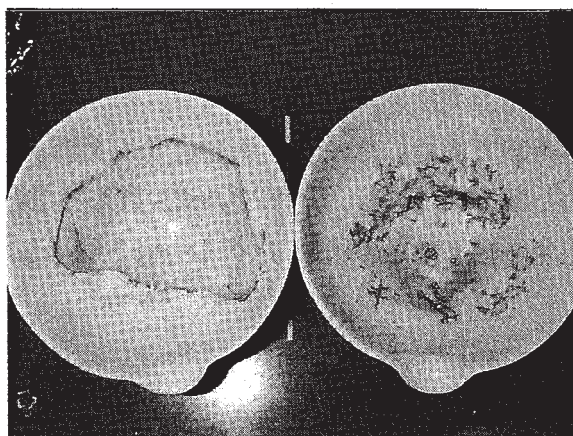


Fig. 3 乾燥後のバクテリアセルロース

## 4. 結果及び考察

### 4-1 炭素源の検討

炭素源を代表的なグルコース、スクロース、マルトース、フルクトースを選んで生産性を調べた。

各糖濃度を5w/v%として、好気性条件下、pH5、30℃で10日間静置培養した。培養終了後、バクテリアセルロース量、pHを測定したところ、スクロースが最も良く、以後の炭素源はスクロース、濃度は5w/v%で行った。その結果をTable 2に示す。

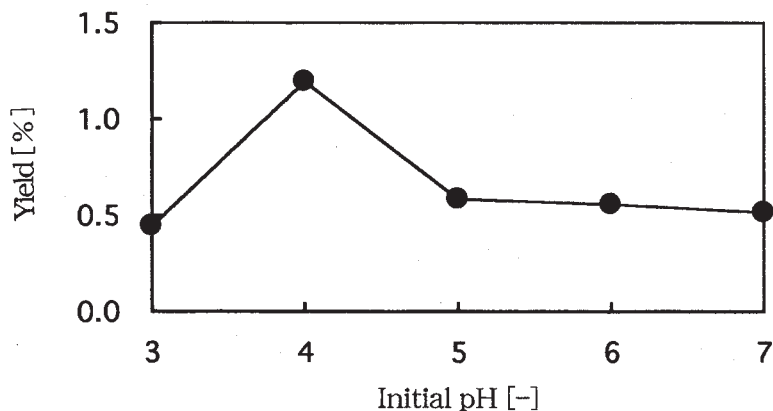
スクロースは実際には滅菌時に熱により一部グルコースとフルクトースに分解するため、個々の糖はグルコース C-test (グルコース)、HPLC (スクロース、フルクトース) を用いて測定した。

Table 2 バクテリアセルロースの生産における炭素源の影響

糖	濃度 [w/v%]	最終 pH	収率 [%]
Glucose	5	2.6	0.23
Fructose	5	3.6	0.5
Galactose	5	3.4	0.71
Maltose	5	4.3	0.58
Sucrose	5	4.1	0.92

(収率 [%] : 初期糖量に対するバクテリアセルロース量)

### 4-2 初期 pH の影響



スクロース5w/v%を炭素源としてpHを3~7の範囲で、30℃、10日間静置培養を行った。その結果をFig. 4に示す。

pH4の時の収率が高いため、初期pHを4として以後の実験を行った。

Fig. 4 初期 pH の影響

### 4-3 添加物の影響

添加物としてフィチン酸、シュアーゴ、Yeast extract、フィチン酸カルシウムを加えて、pH4、30℃、10日間静置培養した。培養終了後、バクテリアセルロース量とpH値を測定した。その結果をTable 3に示した。無添加と比較してフィチン酸の添加によりバクテリアセルロース収量は二倍を超えた。

Table 3 バクテリアセルロース生産における添加物の影響

添加物	濃度 [w/v%]	最終 pH	収率 [%]
なし	—	3.2	0.96
Shur-go	0.05	3.3	1.34
Yeast extract	0.50	3.3	0.96
Calcium phytate	0.05	3.3	1.14
Phytic acid	0.05	3.6	2.16

(収率 [%] : 初期糖量に対するバクテリアセルロース量)

#### 4-4 フィチン酸濃度の影響

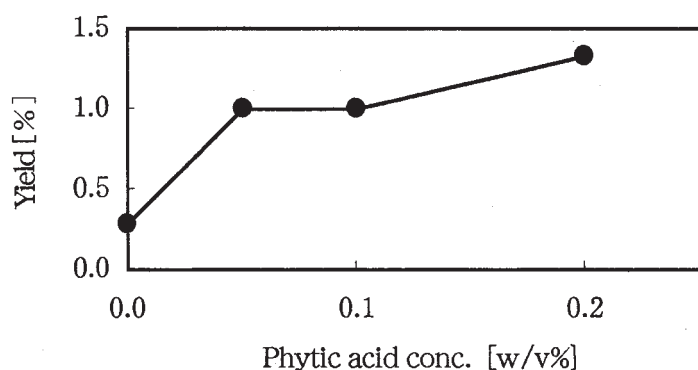


Fig. 5 フィチン酸濃度の影響

バクテリアセルロース生産におけるフィチン酸濃度の影響を Fig. 5 に示した。添加量とともに生産量も増大した。

なお、初期スクロース濃度を変えて (5, 10, 20w/v%)、フィチン酸 (0.05w/v%) 添加の効果を調べたところ、糖濃度 20w/v% が最も収率が高いが、糖濃度とともに増加率は減少した。

#### 5. まとめ

本実験範囲において、バクテリアセルロースの生産性向上の至適条件は

- ・糖はスクロース (糖濃度 20w/v%)
- ・初期 pH4
- ・フィチン酸濃度 0.2w/v%

となった。しかしながら、多くの問題点も明らかになった。それは、

- ・継体培養を繰り返している間に菌の活性が変化してしまう (低下傾向)。
- ・サンプリング時、に表面に生成したセルロース膜を傷つけてしまい、生産性が低下する。

ことである。今後は、今回使用した酢酸菌より生産性の高い菌のスクリーニングと、セルロース膜を壊さずにサンプリングするための実験法の改善が重要となる。

#### 参考文献

- 1) 高井光男, バクテリアセルロース, 紙パ技協誌, 42, 237-244 (1988)
- 2) 山中 茂, 渡辺乙比呂, 井口正俊, 西 美緒, バクテリアセルロースの生産, 物性の特徴とその利用, 日本農芸科学誌, 72, 1039-1044 (1998)